

СРАВНЕНИЕ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЭНЗИМА Q₁₀ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

В.И. Зозина

аспирант, кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
E-mail: zozinavi@gmail.com

Е.С. Мельников

к.фарм.н., ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Л.М. Красных

к.б.н., нач. отдела клинической фармакокинетики, Центр клинической фармакологии, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

О.А. Горошко

к.фарм.н., ст. сотрудник, отдел клинической фармакокинетики, Центр клинической фармакологии, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

В.Г. Кукес

академик РАН, д.м.н., профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Проведена разработка и валидация двух методик количественного определения коэнзима Q₁₀ (CoQ₁₀) в плазме крови: при помощи ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС. С помощью разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС изучена зависимость концентрации CoQ₁₀ в плазме от терапии комбинацией препаратов. Показано, что наиболее чувствительной и воспроизводимой методикой является ВЭЖХ-МС/МС (нижний предел количественного определения (НПКО) составил 0,10 мкг/мл). Одношаговая пробоподготовка осаждением белков, применяемая в методике ВЭЖХ-МС/МС, оказалась более удобной, чем в ВЭЖХ-УФ. Установлено, что НПКО убихинона в методике ВЭЖХ-УФ составил 0,5 мкг/мл. При помощи методики ВЭЖХ-МС/МС была проанализирована средняя концентрация эндогенного CoQ₁₀ у пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями, принимающих препараты статинов, β-блокаторов и блокаторов кальциевых каналов, составившая 0,39 мкг/мл. Сделан вывод о непригодности методики ВЭЖХ-УФ для применения в рутинной практике из-за недостаточного НПКО и, как следствие, низкой чувствительности, в то время как методика ВЭЖХ-МС/МС оказалась селективной, чувствительной, быстрой и удобной для внедрения в рутинную практику.

Ключевые слова: CoQ₁₀, убихинон, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС/МС.

Для цитирования: Зозина В.И., Мельников Е.С., Красных Л.М., Горошко О.А., Кукес В.Г. Сравнение методик количественного определения коэнзима Q₁₀ в плазме крови. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(5):10–14. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-05-02>

Коэнзим Q₁₀ (CoQ₁₀, убихинон) – биологически активное соединение, открытое в 1957 г. в университете Висконсин. По своей структуре он схож с витамином K₂ (менахиноном) и витамином E [1]. Как часть семейства хиноновых соединений, известных как коэнзимы Q, CoQ₁₀ является хиноновым кольцом, с повторяющимся рядом изопреновых звеньев боковой цепи. Коэнзим Q₁₀ имеет две формы: окисленная форма (убихинон) и восстановленная форма (убихинол), которая синтезируется в результате протонирования на карбонильных фрагментах хинонового кольца окисленной формы [2].

В организме человека CoQ₁₀ выполняет множество важных функций. Основная его функция – перенос электронов в митохондриальном каскаде

синтеза аденозитрифосфата с последующим генерированием энергии [3]. В последние несколько лет важность определения CoQ₁₀ приобрела клиническую значимость, так как низкие концентрации CoQ₁₀ в плазме крови были зарегистрированы в ряде кардиологических, нейродегенеративных, раковых и мышечных заболеваний [4].

Такие физико-химические свойства CoQ₁₀, как низкая молекулярная масса, высокая гидрофобность, способность быстро окисляться в условиях окружающей среды, наряду с низкими концентрациями в биологических матрицах, делают процесс количественного определения CoQ₁₀ достаточно затруднительным.

Для количественного и качественного определения CoQ₁₀ использовались многие методы:

вольтамперометрический [5], хемолюминисцентный [6], а также спектрофотометрический [7]. Но наибольшую распространенность обрели ВЭЖХ-методы с различными детектированиями: ультрафиолетовым (УФ) [8], электрохимическим (ЭХ) [(9)] и масс-спектрометрическим (МС) детектированием [10].

Цель исследования – сравнение методик количественного определения CoQ_{10} при помощи ВЭЖХ с УФ-детектированием и МС/МС-детектированием.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Разработка методики количественного определения CoQ_{10} со спектрометрическим детектором проведена на ВЭЖХ Agilent 1200 (США), а с масс-спектрометрическим детектором – на ВЭЖХ-системе «Nexera» с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 («Shimadzu», Япония).

В качестве реактивов применялись: эфир этиловый («Химмед», Россия), этанол «HPLC-grade» (ООО Гатчинский завод, Россия), метанол, ацетонитрил («Biosolve Chimie», Франция), этилацетат, муравьиная кислота, изопропанол, аммиак («PanReac Applichem», Испания), DL-атокоферил ацетат («MP Biomedicals», США).

Пробоподготовка для разработки методики ВЭЖХ-УФ проводилась при помощи жидкостно-жидкостной экстракции этиловым эфиром с последующим упариванием под вакуумом. Сухой остаток растворяли в этаноле и хроматографировали.

В случае использования метода ВЭЖХ-МС/МС процедура экстракции включала в себя осаждение белков при помощи смеси изопропанол : этилацетат (1:1) с последующим центрифугированием и определением надосадочной жидкости.

Валидацию методик проводили по следующим параметрам: прецизионность, точность, линейность, селективность, стабильность, степень извлечения, предел количественного определения и эффект матрицы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики ВЭЖХ-УФ. Для ВЭЖХ с УФ-детектированием в качестве подвижной фазы использовали этанол : изопропанол (90:10) со скоростью потока 0,8 мл/мин. Хроматографическое разделение проводили на колонке «Eclipse XDB-C18» (150×4,6 мм, 5 мкм). При проведении анализа поддерживали температуру 40 °С.

Время удерживания убихинона составило 12,9 мин. Убихинон имел максимум поглощения в УФ-спектре при $\lambda = 275$ нм при спектрофотометрическом анализе.

Построение калибровочного графика выполнялось с целью оценки линейности методики (рис. 1). Концентрации в калибровочных пробах составили 0,5, 0,75, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 мкг/мл. Коэффициент корреляции R был равен 0,999, что является высоким показателем достоверности аппроксимации. Нижний предел количественного определения (НПКО) составил 0,5 мкг/мл.

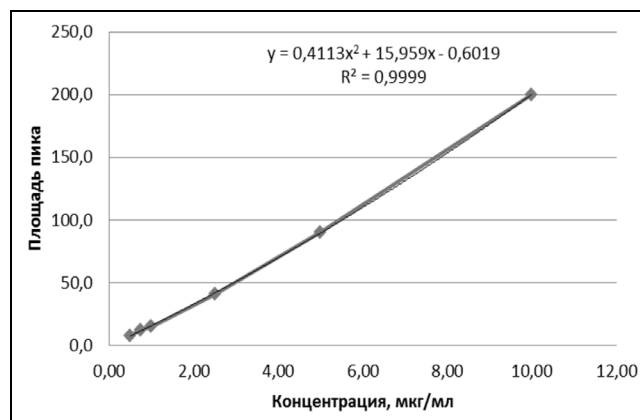


Рис. 1. Калибровочный график (ВЭЖХ-УФ)

Кроме того, НПКО оказался недостаточным, чтобы использовать данный метод для определения CoQ_{10} в плазме крови, так как содержание CoQ_{10} у здоровых людей варьирует в пределах 0,9–1,3 мкг/мл, а у больных, согласно литературным данным, может снижаться до 0,10 мкг/мл.

Валидация разработанной методики количественного определения убихинона в плазме крови соответствовала критериям приемлемости [11].

Разработка методики ВЭЖХ-МС/МС. При разработке методики количественного определения ВЭЖХ-МС/МС подвижная фаза состояла из элюента А: деионизированной воды с добавлением раствора муравьиной кислоты (0,1%, об.) и раствора концентрированного аммиака (0,04%, об.) и элюента Б: смеси изопропанол/этилацетат (9:1) с добавлением раствора муравьиной кислоты (0,1%, об.) и раствора концентрированного аммиака (0,04%, об.). Анализ проводился в градиентном режиме. Использовали метод ионизации распылением в электрическом поле (ESI) в положительном режиме. Детектирование проводилось в режиме мониторинга множественных реакций. Токоферол ацетат был выбран в качестве внутреннего стан-

дарта, и его ионом-предшественником являлся протонированный молекулярный ион $[M+H]^+$ с 473,25 m/z (дочерние ионы 165,10 и 207,00 m/z.). Ион-предшественник убихинона – $[M+NH_4]^+$: 880,7 m/z и 882,7 m/z а его фрагментный ион – 197,1 m/z.

Валидацию методики проводили по классической схеме. Селективность методики опреде-

лить практически невозможно, так как приобретение плазмы человека без содержания CoQ₁₀ не представляется возможным. Поэтому селективность обеспечивалась при помощи разработки эффективной методики разделения, а также оптимизации параметров детектирования.

Масс-спектр фрагментного иона убихинона представлен на рис. 2.

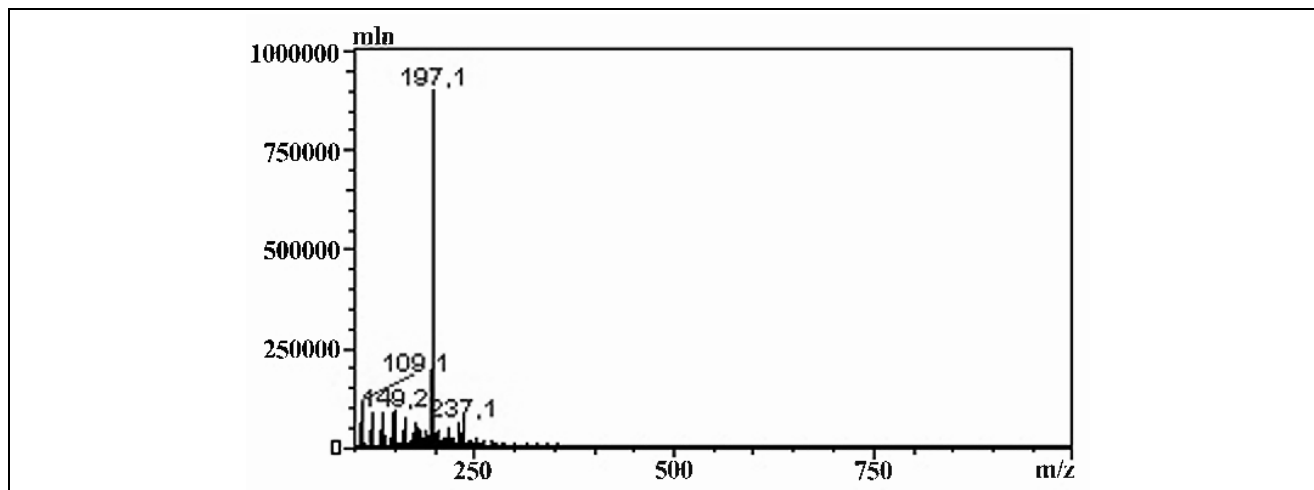


Рис. 2. Масс-спектр фрагментного иона убихинона

Линейность методики проверяли путем построения усредненного калибровочного графика. При приготовлении калибровочных образцов для уравнивания эндогенного фона был использован пул плазмы. Подготовка проб проводилась как описано выше. Концентрации в калибровочных пробах составляли 0,10, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 2,50 и 5,00 мкг/мл (рис. 3). Коэффициент корреляции *R* был равен 0,995.

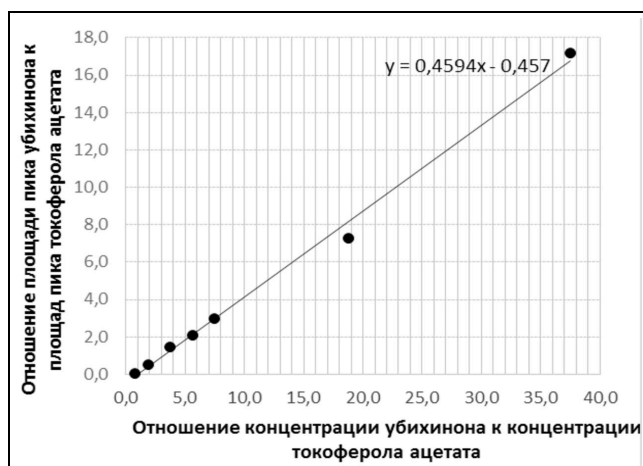


Рис. 3. Калибровочный график (ВЭЖХ-МС/МС)

Точность и прецизионность оценивали на четырех уровнях: 0,10, 0,25, 2,50, 5,00 мкг/мл. Были проанализированы пять образцов контроля качества на каждом уровне в трех независимых аналитических партиях. В этих экспериментах *RSD* и относительная ошибка не превышали 11,8 и 13,4% соответственно.

В соответствии с данными о прецизионности и точности величина НПКО составила 0,10 мкг/мл.

Долгосрочная стабильность Q₁₀ в плазме крови без стабилизатора при температуре –30 °С составляла одну неделю, а со стабилизатором – три месяца при –30 °С. Исходный стандартный раствор Q₁₀ со стабилизатором был стабилен в течение шести месяцев при температуре –30° С.

С помощью разработанной ВЭЖХ-методики количественного определения убихинона в плазме крови с масс-спектрометрическим детектором определили содержание убихинона у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Определение CoQ₁₀ в плазме крови пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями. Отобраны и проанализированы 30 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), а также

хронической сердечной недостаточностью, которые находились на терапии, включающей комбинацию следующих групп препаратов: статины (аторвастатин, симвастатин), β -блокаторы (метопролол, бисопролол, атенолол), а также блокаторы кальциевых каналов (амлодипин, нифедипин).

В таблице представлено усредненное значение концентрации убихинона в плазме крови у пациентов с ИБС и хронической сердечной недостаточностью и здоровых добровольцев, а также результаты статистического анализа. Концентрация общего CoQ₁₀ у пациентов варьировала от 0,3 до 0,5 мкг/мл.

Таблица. Сравнение влияния групп препаратов со здоровыми добровольцами на концентрацию CoQ₁₀ в плазме крови

Параметры	Пациенты	Здоровые добровольцы
Mean, мкг/мл	0,39	1,02
SD	0,05	0,13
n	29	30
SEM	0,008	0,023
t-критерий Стьюдента	24,45	

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что у пациентов, принимавших препараты из групп статинов, β -блокаторов, а также блокаторов кальциевых каналов, понижался уровень CoQ₁₀ в плазме крови.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и валидированы две методики ВЭЖХ определения CoQ₁₀: с УФ- и МС/МС-детекторами. Так как в методике ВЭЖХ-УФ НПКО убихинона оказался недостаточным (0,5 мкг/мл), данная методика не подходит для его рутинного определения в плазме крови человека. Кроме того, пробоподготовка для ВЭЖХ-УФ является более трудоемкой. В методике ВЭЖХ-МС/МС НПКО составил 0,10 мкг/мл, а аналитический диапазон равнялся 0,10–5,0 мкг/мл, что означает ее пригодность для рутинного анализа. Помимо этого, данная методика является быстрой и простой.
2. При помощи ВЭЖХ-методики с масс-спектрометрическим детектором удалось проанализировать и сравнить концентрацию CoQ₁₀ у пациентов с сердечно-сосудистыми патология-

ми, находящихся на терапии определенными группами препаратов, и здоровыми добровольцами, чем доказали возможность ее использования в рутинном анализе.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lunetta S., Roman M. Determination of coenzyme Q10 content in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography-UV: collaborative study // J AOAC Int. 2008; 91(4):702–8.
2. Orozco D., Skamarack J., Reins K., et al. Determination of ubiquinone (coenzyme Q10, ubiquinol-10) in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation // J AOAC Int. 2007; 90(5):1227–36.
3. Raitakari O.T., McCredie R.J., Witting P., et al. Coenzyme Q improves LDL resistance to ex vivo oxidation but does not enhance endothelial function in hypercholesterolemic young adults // Free Radic Biol Med. 2000; 28(7):1100–5.
4. Cobanoglu U., Demir H., Cebi A., et al. Lipid peroxidation, DNA damage and coenzyme Q10 in lung cancer patients--markers for risk assessment? // Asian Pac J Cancer Prev. 2011; 12(6):1399–403.
5. Michalkiewicz S. Voltammetric determination of coenzyme Q10 in pharmaceutical dosage forms // Bioelectrochemistry. 2008; 73(1): 30–6.
6. Battino M., Girotti S., et al. Free radical scavenging activity of coenzyme Q measured by a chemiluminescent assay // Anal Chim Acta. 1991; 255:367–71.
7. Karpinska J., Mikoluc B., Piotrowska-Jastrzebska J. Application of derivative spectrophotometry for determination of coenzyme Q10 in pharmaceuticals and plasma // J Pharm Biomed Anal. 1998; 17(8):1345–50.
8. Karpinska J., Mikoluc B., Motkowski R., et al. HPLC method for simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma // J Pharm Biomed Anal. 2006; 42(2):232–6.
9. Jiang P., Wu M., Zheng Y., et al. Analysis of coenzyme Q(10) in human plasma by column-switching liquid chromatography // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004; 805(2):297–301.
10. Hansen G., Christensen P., Tuchsén E., et al. Sensitive and selective analysis of coenzyme Q10 in human serum by negative APCI LC-MS // Analyst. 2004; 129(1):45–50.
11. Иванов Р., Секарёва Г., Кравцова О., Кудлай Д., Лукьянов С., Тихонова И., Дёмин А., Максумова Л., Никитина И., Обухов А., Зайцев Д., Степанов А., Носырева М., Самсонов М. Правила проведения исследований биоаналоговых лекарственных средств (биоаналогов) // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2014. № 1. С. 21–36. (Ivanov R., Sekaryova G., Kravcova O., Kudlaj D., Luk'yanov S., Tihonova I., Dyomin A., Maksumova L., Nikitina I., Obuhov A., Zajcev D., Stepanov A., Nosyрева M., Samsonov M. Pravila provedeniya issledovaniy bioanalogovykh lekarstvennykh sredstv (bioanalogov) // Farmakokinetika i farmakodinamika. 2014. № 1. S. 21–36).

Поступила 7 февраля 2019 г.

THE COMPARISON OF METHODS FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF COENZYME Q₁₀

© Authors, 2019

V.I. Zozina

Post-graduate Student, Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)
E-mail: zozinavi@gmail.com

E.S. Melnikov

Ph.D. (Biol.), Assistant of the A.P. Arzamastsev Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)

L.M. Krasnykh

Ph.D. (Biol.), Head of Clinical Pharmacokinetics, Clinical Pharmacology Center, FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation

O.A. Goroshko

Ph.D. (Pharm.), Senior Researcher, Clinical Pharmacokinetics, Clinical Pharmacology Center, FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation

V.G. Kukes

Academician of the RAS, Dr.Sc. (Med.), Professor, Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)

Background. Coenzyme Q₁₀ is a biologically active compound that performs many important functions in the body: electron transfer in the mitochondrial cascade of adenosine triphosphate synthesis, antioxidant, preventing lipid peroxidation.

Study Objective. The aim is to develop and compare methods for the quantitative determination of coenzyme Q₁₀ in order to identify the most sensitive, simple and reproducible one.

Materials and methods. Coenzyme Q₁₀ was determined using high performance liquid chromatography with spectrophotometric and mass spectrometric detectors. In developing the HPLC-MS / MS it was used the electrospray ionization (ESI) in positive mode. Detection was carried out in the mode of monitoring multiple reactions (MRM).

Results. The study developed and validated two methods for the determination of coenzyme Q₁₀ in plasma. It was shown that the most sensitive and reproducible technique was HPLC-MS / MS (the LLOQ constituted 0.10 µg / ml). One-step sample preparation involving proteins precipitation, used in the HPLC-MS / MS method was more convenient than in HPLC-UV one. The LLOQ of ubiquinone in the HPLC-UV method was 0.5 µg / ml. Using the HPLC-MS / MS technique, we analyzed the average concentration of endogenous CoQ₁₀ in patients with cardiovascular pathologies administrating statins, β-blockers and calcium channel blockers, which constituted 0.39 µg / ml.

Conclusion. It was concluded that the HPLC-UV method is unsuitable for routine practice use due to the high LLOQ (0.5 µg / ml) and its low sensitivity. While the of HPLC-MS / MS method was selective, sensitive, fast and convenient for introduction into routine practice.

Key words: CoQ₁₀, ubiquinone, HPLC-UV, HPLC-MS/MS.

For citation: Zozina V.I., Melnikov E.S., Krasnykh L.M., Goroshko O.A., Kukes V.G. The comparison of methods for the quantitative determination of coenzyme Q₁₀. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(5):10–14. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-05-02>